

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07K 15/04, C12P 21/02 // A61K 37/02 (C12P 21/02 C12R 1/91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 91/18925  (43) 国際公開日 1991年12月12日 (12. 12. 1991)
(21) 国際出願番号 POT/JP91/00739 (22) 国際出願日 1991年5月31日 (31. 05. 91)  (30) 優先権データ 特願平 2/139809 1990年5月31日 (31. 05. 90) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社 (MBIJI SEIKA KAISHA, LTD.) (JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 松永啓太 (MATSUNAGA, Keita) (JP/JP) 大澤福市 (OHSAWA, Fukuichi) (JP/JP) 真壁 理 (MAKABE, Osamu) (JP/JP) 〒222 神奈川県横浜市港北区藤岡町760 明治製菓株式会社 薬品総合研究所内 Kanagawa, (JP) 厨信一郎 (KURIYA, Shinichiro) (JP/JP) 緒方清行 (OGATA, Kiyoyuki) (JP/JP) 野村武夫 (NOMURA, Takeo) (JP/JP) 〒113 東京都文京区千駄木1-1-5 日本医科大学内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 八木田茂, 外 (YAGITA, Shigeru et al.) 〒105 東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, OH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FI, FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), NO, SE (欧州特許), US.  添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : NOVEL MEGAKARYOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR AND PRODUCTION THEREOF (54) 発明の名称 新規な巨核球系コロニー刺激因子とその製法 (57) Abstract <p>A homogeneous megakaryocyte colony stimulating factor (Meg-CSF) comprising a protein having an activity of forming a megakaryocyte colony from human or mouse myeloid cells in vitro and an activity of increasing the numbers of megakaryocyte precursor cells and megakaryocytes in vivo, said Meg-CSF being produced by culturing cell strains of a large human-derived pulmonary cell carcinoma, e.g. PC-13 strains, or human pulmonary carcinoma cell strains, i.e. MC-1 strains, separated as monoclonal cells from the PC-13 strains, recovering the supernatant of the resulting culture medium, separating the Meg-CSF from the supernatant, and purifying it by a newly developed purification technique. The obtained homogeneous Meg-CSF is a homogeneous protein having a molecular weight of about 23,000 according to gel filtration or about 20,000 according to SDS-PAGE and an isoelectric point of 4.5 to 5.5. The partial amino acid sequence of the protein has been determined. The homogeneous Meg-CSF is useful for treating a certain kind of thrombocytopenia.</p>		

A27 - 08/252,491

Best Available Copy

(57) 要約

本発明においては、ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株、例えばPC-13株、若しくはPC-13株から単一クローン細胞として分離されたヒト肺癌細胞株MC-1株を培養し、得られた培養物から培養液上清を回収する。次いで、その培養液上清から、ヒト又はマウスの骨髓細胞にin vitroで作用させる時に骨髓細胞から巨核球系コロニーを形成させる活性とin vivoで巨核球前駆細胞及び巨核球の数を増加させる活性とをもつ蛋白質から成る巨核球系コロニー刺激因子(Meg-CSF)を採取し、新たに工夫された精製法で均質な純度まで精製する。本発明で得られた均質(homogeneous)な巨核球系コロニー刺激因子はゲル濾過法で測定すると分子量約23,000及びSDS-PAGE法で測定すると分子量約20,000を有し且つ等電点4.5~5.5を有する均質な蛋白質である。この蛋白質の部分アミノ酸配列が決定された。本発明による均質な巨核球系コロニー刺激因子は、或る種の血小板減少症の治療に有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT オーストリア  
AU オーストラリア  
BB パルバードス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ共和国  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コート・ジボアール  
CM カメルーン  
CS チェコスロバキア  
DE ドイツ  
DK デンマーク

ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GH ギニア  
GB イギリス  
GR ギリシャ  
HU ハンガリー  
IT イタリア  
JP 日本  
KP 朝鮮民主主義人民共和国  
KR 大韓民国  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリランカ  
LU ルクセンブルグ  
MC モナコ  
MG マダガスカル

ML マリ  
MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
NL オランダ  
NO ノルウェー  
PL ポーランド  
RO ルーマニア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SN セネガル  
SU ソビエト連邦  
TD チャド  
TG トーゴ  
US 米国

## 明 細 書

## 新規な巨核球系コロニー刺激因子とその製法

技術分野

本発明は、ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株を培養し  
5 て得られた培養液上清から単離された均質な蛋白質か  
ら成り且つヒト又はマウスの骨髓細胞に*in vitro*で作  
用させる時に巨核球系コロニーを形成させる活性をも  
つと共に、*in vivo*で巨核球前駆細胞及び巨核球の数  
を増加させる活性を持つ新規の均質(homogeneous)な  
10 巨核球系コロニー刺激因子、及びその製法に関する。

背景技術

血小板は、血管の破れで起る出血が自然に停まる止  
血過程中に起る血栓形成、及び血液凝固の促進に重要  
な働きを行っている。ヒトにおいて、この血小板は、  
15 骨髓幹細胞から、巨核球前駆細胞を経て増殖、分化し  
て生成され、骨髓中に存在する巨核球より血流中に放  
出される。

巨核球系コロニー刺激因子(Megakaryocyte Colony  
Stimulating Factor; Meg-CSFと略記される)はヒト又  
20 は哺乳動物の血液内に存在しており、しかも骨髓幹細  
胞、及び(又は)巨核球前駆細胞に働いて、これら細  
胞の増殖と巨核球への分化を促進すると言われている  
生理活性物質である。その巨核球系コロニー刺激因子  
は、*in vitro*でヒト又はマウスの骨髓細胞から巨核球  
25 系コロニーを形成する該因子の活性、即ち巨核球系コ

コロニー刺激活性 (Megakaryocyte Colony Stimulating Activity: Meg-CSAと略記される) を指標として検定されて測定される。現在、巨核球系コロニー刺激活性は、再生不良性貧血患者尿中 (Kawakita, M. et al. 「Blood」 61, 556(1983))、巨核球低形成性血小板減少症患者の血漿中 (Hoffman, R. et al. 「J.Clin. Invest.」 75, 1174(1985))、インゲンマメレクチン (PHA) 刺激ヒト末梢リンパ球の培養液上清中 (Messner, H. A. et al. 「J. Cell physiol. Suppl.」1, 45) に  
5 発現していることが認められている。しかし、巨核球系コロニー刺激因子を回収し、精製し、医薬品に製剤化しようとする場合には、前記の患者の尿及び血漿を原料として入手することが必要であるが、これら尿、血漿等はいずれも、生体試料であること、個体差がある  
10 こと、ウイルス、細菌による感染の可能性があるなどの欠点がある。これらの理由により、均一な生体材料の形でかつ大量に、巨核球系コロニー刺激因子の製造用の原料を得ることは困難である。

他方、ヒト胎児腎細胞の培養液上清から単離されて  
20 SDS-PAGEで15,000 ダルトンの分子量とpI=5.1の等電点を有し、巨核球細胞中の血小板因子4(PF4)様の蛋白質の合成を促進する活性を持つ巨核球促進因子 (Megakaryocyte Stimulatory Factor; MSF) 及びその製造法が報告されている(ヨーロッパ特願公開0260918  
25 A2号又は特開昭63-239298号明細書参照)。この公知の

巨核球促進因子(MSF)は巨核球系細胞に特異的に作用するけれども巨核球系コロニー刺激活性(Meg-CSA)を示さない。

5 又、本発明者らは既に、巨核球系コロニー刺激因子の製造用の安定な原料源として利用できるヒト肺大細胞癌の細胞株を見だし、これより巨核球系コロニー刺激因子を製造することに成功し且つ巨核球系コロニー刺激因子の精製品を収得した発明について出願をしている(PCT特許願第PCT/JP89/00960号；国際出願日  
10 1989年9月21日；PCT出願国際公開明細書W0 90/03397号参照)。

上記のPCT特許出願明細書の中には、均一な原料として大量に入手可能である、ヒト由来の肺大細胞癌細胞PC-13株(日本国、群馬県藤岡市に所在の免疫生物研究所より市販で入手)を培養して得られた培養液上清  
15 中に巨核球系コロニー刺激因子の活性を見いだしたこと、更に巨核球系コロニー刺激因子の単離を効率良く行うため、PC-13株のうちから、巨核球系コロニー刺激因子の高生産性株の選択によりヒト肺大細胞癌細胞  
20 MC-1株を単離したこと、並びに無血清培地を用いる上記の細胞株の細胞培養法の開発を行ったこと及び新規物質として巨核球系コロニー刺激因子の精製品を収得したことが開示されている。

その後、本発明者らは、先に収得した巨核球系コロ  
25 ニー刺激因子の精製品について分析、研究を続けたが、

この精製品は完全に均質であるとは必らずしも言えないことを見出したので、本因子の別段の精製をさらに進め、医薬として実用可能な且つ精製された均質な蛋白質としての巨核球系コロニー刺激因子を単離すること、及びその単離した均質な巨核球系コロニー刺激因子を使い、この蛋白質のアミノ酸配列を決定する試験を行って大量生産のため遺伝子クローニング用のプローブを作成することを目的として研究を続けていた。

ところで、生理活性蛋白質を医薬品として利用するため大量かつ均質な純度で製造しようと試みる場合には、その蛋白質をコードする遺伝子を分離、取得できるならば、その遺伝子を発現ベクターに組み込み動物細胞または大腸菌に導入して目的の蛋白質を生産させる遺伝子工学技術を利用できる可能性があることは知られている。更に、その遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列の一部又は全部が決定できるならば、そのアミノ酸配列から推測できる所望の DNA 配列をもつ DNA 断片を DNA プローブとして作製し、作成された DNA プローブを利用することにより、目的の遺伝子を遺伝子工学的技法により単離することができる可能性があることも知られている。

本発明は巨核球系コロニー刺激因子を、そのアミノ酸配列を決定できる純度の均質な蛋白質にまで精製することを目的の一つとしている。この蛋白質のアミノ酸配列を決定し、遺伝子クローニング用の DNA プロ

ープを作製することも本発明の目的の一つである。

これらの目的から、本発明者らは、先に取得した巨核球系コロニー刺激因子を均質な蛋白質になるまで精製することを意図して研究を行って来た。

5

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の如き最近の研究の結果として、下記に示すように巨核球系コロニー刺激因子の新しい精製法を工夫することにより、目的とする均質な蛋白質の形の巨核球系コロニー刺激因子を単離することに成功した。今回、本発明者らにより得られた巨核球系コロニー刺激因子の均質な精製品がin vivo で作用させると、巨核球前駆細胞と巨核球との両者を増殖する活性を有することを本発明者らは確認した。そして、今回得られた巨核球系コロニー刺激因子の均質な精製品がその物理化学的性質及び部分アミノ酸配列並びに生物学的性質の測定により新規な物質であることを確認した。また、今回得られた巨核球系コロニー刺激因子の均質な精製品が、(a) SDS-PAGE、すなわちドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定すると、分子量約20,000の単一バンドを示すこと、(b) ゲル濾過法で測定すると、分子量約23,000であり、紫外線吸収(280nm) に単一ピークを示すこと、(c) 2次元電気泳動法で単一スポットを示すこと、(d) 280nm の吸光度の単位あたり、少なくとも  $3 \times 10^7$  CFU の比活性を示すことを見出し、そしてそれにより、本

10

15

20

25

発明の巨核球系コロニー刺激因子が精製された均質な物質であることを確認した。更に、この均質な巨核球系コロニー刺激因子の部分アミノ酸配列を自動エドマン分解法により決定して確認した。これらの知見に基づいて、本発明は完成した。

従って、第1の本発明においては、下記の諸性質をもつことを特徴とするヒト細胞由来の均質な巨核球系コロニー刺激因子が提供される。

(a) 分子量：

- 10      ① ゲル濾過法で測定すると、本因子の分子量は約23,000である。
- ② SDS-PAGE法で還元剤の存在下で測定すると、本因子の分子量は約20,000である。

(b) 等電点：

- 15      等電点クロマトグラフィーで測定すると、本因子は等電点 $pI=4.5\sim 5.5$ を示す。

(c) 280nm の紫外線の吸光度単位あたり、本因子は少なくとも  $3 \times 10^7$  CFU の比活性を示す。

(d) 部分アミノ酸配列

- 20      本因子はその構成蛋白質に下記の部分アミノ酸配列を含む：

Tyr-Glu-Asp-Glu-X-Pro

(但し、この配列中の X は未同定のアミノ酸残基を表わす)。

- 25      更に、本発明の均質な巨核球系コロニー刺激因子は、



詳しくは下記の諸性質を有する。

(a) ヒト由来の肺大細胞癌細胞 PC-13株の培養液上清中から、若しくは該 PC-13株から単一クローン株として分離されたヒト肺大細胞癌細胞株MC-1株(「微工研」にブタペスト条約下で「FERM BP-2574」の寄託番号で寄託されている)の培養液上清中から均質な蛋白質として本因子が単離できる。

(b) 分子量：

① ゲル濾過法で測定すると、本因子の分子量は約23,000である。本因子を単一に含む溶液はその紫外線吸光度と巨核球系コロニー刺激活性とを測定すると、夫々に単一なピークを示す。

② SDS-PAGE法で還元剤の存在下で測定すると、本因子の単一バンドが分子量約20,000の泳動位置に認められることから、本因子はこの条件下で約20,000の分子量を有すると認められる。

(c) 等電点：

等電点クロマトグラフィーで測定すると、等電点  $pI = 4.5 \sim 5.5$  である。

(d) 部分アミノ酸配列

本因子はその構成蛋白質に下記の部分アミノ酸配列を含む。

Tyr-Glu-Asp-Glu-X-Pro

但し、上記の配列中の X は未同定のアミノ酸残基を表わす。

(e) 活性の熱安定性：

80℃で60分間本因子を加熱すると失活して、活性に熱安定性がない。

(f) 酵素に対する活性の安定性：

- 5           ノイラミニダーゼで 本因子を処理しても活性は安定である。キモトリプシンで本因子を処理すると失活して、活性はキモトリプシン処理に対して安定でない。

(g) サイトカイン等の活性の有無：

- 10           本因子はインターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、腫瘍壊死因子(TNF)、エリスロポエチン(EPO)の各活性を示さない。

(h) 抗原性：

- 15           インターロイキン-1 $\alpha$ 抗体、インターロイキン-1 $\beta$ 抗体、ヒトGM-CSF抗体、ヒトインターロイキン-3抗体により本因子の活性は中和されない。またラジオイムノアッセイにより評価すると、本因子はプロラクチン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、成長ホルモ  
20           ン(GH)、インシュリン、バソプレッシン(ADH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)との間に免疫学的交差性を示さない。

(i) 界面活性剤に対する活性の安定性：

- 25           ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で本因子を処理すると、活性が部分的に失われて不安定である。また、

本因子をTween® 20 (すなわちポリオキシエチレン  
(20) ソルビトールモノラウレート)、Nonidet P40  
(すなわちポリオキシエチレン(9)-p-tert-オクチル  
フェノール)、Triton® X-100 (すなわちポリオキシ  
エチレン(9~10)-p-tert-オクチルフェノール)の非  
5 イオン系界面活性剤で処理しても本因子の活性は実  
質的に安定である。

(j) 特異な生理活性：

本因子はヒト又はマウスの骨髓細胞にin vitroで  
10 働くと、巨核球系コロニーを形成させる活性、即ち  
巨核球系コロニー刺激活性を示す。また、マウスに  
本因子を投与すると、巨核球及び巨核球前駆細胞を  
増殖させる活性を示す。

更に、第2の本発明では、ヒト由来の肺大細胞癌の  
15 細胞株を培養し、得られた培養物から巨核球系コロニ  
ー刺激因子を含む培養液上清を回収し、その培養液上  
清から巨核球系コロニー刺激因子を採取し、それを均  
質な蛋白質の形まで精製することを特徴とする、第1  
の本発明による諸性質をもつ均質な巨核球系コロニー  
20 刺激因子を製造する方法が提供される。

発明を実施するための最良の形態

本発明による巨核球系コロニー刺激因子を生産する  
ためには、一般的には、前記のヒト由来の肺大細胞癌  
の細胞株、特に前記の PC-13株又はヒト肺大細胞癌細  
胞株 MC-1株を、動物細胞の培養に通常用いられる培地  
25

中で培養し、これにより、得られた培養物の上清中に巨核球系コロニー刺激因子を産生させ、蓄積させる。

この培養方法に用いられる培地としては、例えば公知の RPMI-1640 培地、ダルベッコ改変イーグル培地、  
5 Ham's F12 培地、等が単独、もしくはこれらの 2 種以上を混合して用いられる。当該培地中には 0 ~ 10 % の牛胎児血清、もしくは亜セレン酸、ピルビン酸、エタノールアミン、トランスフェリン、血清アルブミン、  
10 HEPES 等を添加してもよい。培養は、培養すべき細胞を培地に、たとえば  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$  細胞 / ml の細胞濃度 (初発) になるような量で接種し、次いで細胞の生育と増殖が可能である 35 ~ 38 °C の温度、好ましくは 37 °C で、5 % CO<sub>2</sub> の存在下に水蒸気で飽和された空気中で行うことが好ましい。培養器は、動物細胞の培養用の  
15 各種フラスコ、シャーレ、ローラーボルト等を用いることができる。また、マイクロキャリアを用いてスピナーボトル中で細胞を培養することもできる。無血清の条件下、もしくは、低濃度血清 (2 % 以下) の条件下で、培養を行うときは、培養器の内壁の細胞接着面をコラーゲン、ゼラチン等の細胞付着因子で予じめ  
20 処理しておくことが望ましい。培養時間は通常 2 ~ 6 日間程度で十分である。

その後、得られた培養物から培養液上清を回収する。この培養液上清中に、本発明の巨核球系コロニー刺激  
25 因子が産生され蓄積されている。

なお、前記の PC-13 株細胞は細胞の培養に当たって  
固体面に付着しないと増殖できない種類の付着細胞で  
あり、この PC-13 株から巨核球系コロニー刺激因子の  
産生能が高い単一クローン株を分離するためには付着  
5 細胞のクローン化に一般的な手法が用いられる。例え  
ば、限界希釈法、コロニー形成法等を用いることがで  
きる。これらの方法によって得られた細胞を別々に分  
けて個別に培地中で  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  細胞/ml の濃度  
まで増殖させ、得られた夫々の培養液上清中の巨核球  
10 系コロニー刺激活性を *in vitro* の評価系で検索し、こ  
れにより本発明の巨核球系コロニー刺激因子産生能の  
高いクローン株を検出して単離できる。このクローン  
株を単独に更に増殖させると、効率よく巨核球系コロ  
ニー刺激因子を生産できる。

15 培養液上清からの本発明の巨核球系コロニー刺激因  
子の回収と精製は、例えば、当該上清を、透析、限外  
濾過、塩析、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、  
等電点クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイ  
トクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、  
20 レクチンカラム、逆相クロマトグラフィー等を適宜組  
み合わせることによって行われる。より具体的には、  
例えば、下記のような 6 段階よりなる方法によって巨  
核球系コロニー刺激因子の回収と精製を行うのが都合  
がよい。

### 1. ヒドロキシアパタイトカラムによる活性物質の回収

培養液上清をヒドロキシアパタイト (HA) カラムを通過させることにより活性物質をHAカラムに吸着させ、さらに吸着された活性物質を溶出により分離、回収する。溶出はpH 7～8、0.2～0.5M程度のリン酸ナトリウム、もしくは、リン酸カリウム水溶液で行うことが望ましく、蛋白質が吸収する波長 280nmの紫外線 (UV) の吸光度をモニターしながら行う。この波長のUV吸収のある溶出液画分をまとめ、活性物質を含む活性画分として採取する。

### 2. ConA結合担体カラム・クロマトグラフィーによる精製

上記溶出された活性画分を、そのままConA (コンカナバリン A) 結合担体カラム例えばConA結合アガロースのカラムを通過させ、吸着されないで通過した画分を回収する。こうして吸着されずに通過して回収された画分のうちで、上と同様に、UV 280nmでの吸光度をモニターし、このUV吸収を示し且つ活性物質を含む活性画分をまとめ、ConA通過画分と称する。

### 3. 疎水性クロマトグラフィーによる精製

上記のConA通過画分に対して、硫酸アンモニウムを30～45%飽和量、攪拌しながら加え、1～12時間後、遠心により遠心上清を得る。次にこの上清を、疎水性担体カラムに通して活性物質を吸着させ、吸着された

画分を次に溶出により回収する。疎水性担体としては、  
蛋白の分離に適した疎水基を持つ担体、具体的には、  
TSKgel Butyl-トヨパール650(東ソー社製)、TSKgel  
Phenyl-トヨパール650(東ソー社製)、Butyl-セフ  
5    ァロース(Pharmacia社製)、Phenyl-セフアロース  
(Pharmacia社製)、Phenyl-スーパーロース(Pharmacia  
社製)などがあげられる。吸着は硫酸アンモニウムを  
30~45%飽和量含むpH 7~9、10~50mM程度の緩衝液  
を用いて行い、溶出は硫酸アンモニウムを0~45%飽  
10   和量含むpH 7~9、10~50mM程度の緩衝液で硫酸アン  
モニウムの濃度勾配法で行うことが望ましい。

#### 4. ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィーによる精製

前の疎水性クロマトグラフィーで得られた活性画分  
15   を、ヒドロキシアパタイト(HA)カラムに吸着させ、吸  
着された画分を次に溶出により回収する。吸着はpH 7  
~9、0.01~0.05M程度のリン酸ナトリウム、もしくは  
は、リン酸カリウムの緩衝液を用いて行い、溶出はpH  
7~9、0.01~0.5M程度のリン酸ナトリウム、もしくは  
20   は、リン酸カリウムの緩衝液で濃度勾配法で行うこと  
が望ましい。

#### 5. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

前段階のヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィー  
で得られた活性画分を、透析、限外濾過、等の手段  
25   を用いて脱塩することにより又は希釈により塩濃度を

下げ、次に陰イオン交換体に通して活性物質を吸着させ、吸着された物質を、イオン交換体からの脱着により溶出させることにより活性画分として回収する。陰イオン交換体として、具体的には、DEAE-トヨパール  
5 (東ソー社製)、QAE-トヨパール (東ソー製)、DEAE-セファロース (Pharmacia社製)、Q-セファロース (Pharmacia社製)、Mono-Q (Pharmacia社製) などがあげられる。陰イオン交換体への活性物質の吸着はpH 7  
10 ～ 9、0.01～0.05M 程度の塩濃度で行い、また溶出は pH 7～9、0.1～1M程度の塩濃度勾配溶出法で行うことが望ましい。

#### 6. 陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製

前段階の陰イオン交換クロマトグラフィーで得られた活性画分を、透析、限外濾過、等の手段を用いて脱塩することにより又は希釈により塩濃度を下げ、次に  
15 陽イオン交換体に通して活性物質を吸着させ、吸着された物質を陽イオン交換体からの脱着により溶出させることにより活性画分として回収する。陽イオン交換体として、具体的には、CM-トヨパール(東ソー社製)、  
20 SP-トヨパール (東ソー社製)、CM-セファロース (Pharmacia社製)、S-セファロース(Pharmacia社製)、Mono-S(Pharmacia社製)、IEC SP-420N(昭和電工社製) などがあげられる。陽イオン交換体への活性物質の吸着はpH 4～6、0.01～0.05M 程度の塩濃度で行い、また  
25 溶出はpH 4～6、0.1～1M程度の塩濃度勾配溶出法



で行うことが望ましい。このように回収された溶出分画のうちの適当な活性画分から目的物質を採取する。すなわち、目的の巨核球系コロニー刺激因子を単独に含む適当な回収された活性分画を集めて、目的物質の溶液として採取する。この溶液を必要ならば透析により脱塩すると、目的の巨核球系コロニー刺激因子の均質な精製品の水溶液が得られる。

上記の各々の精製段階における本発明の巨核球系コロニー刺激因子の検出はin vitroの巨核球系コロニー刺激活性(Meg-CSA)を指標として行うことができる。

なお、上記の6段階よりなる回収及び精製法は本発明による巨核球系コロニー刺激因子の精製品の採取の一例を示したにすぎず、勿論、他の方法によって回収及び精製してもよい。

本発明の均質な巨核球系コロニー刺激因子はin vitroでヒト及びマウスの骨髓細胞から巨核球系コロニーを形成する過程を促進する。即ち、巨核球系コロニー刺激活性を有する。また更にin vivoで巨核球前駆細胞、及び、巨核球の増殖を促進するものである。この巨核球系コロニー刺激因子は、巨核球前駆細胞からの巨核球系細胞への分化並びに巨核球系細胞の増殖の研究用試薬として、また医薬品としても使用される。

本発明の均質な巨核球系コロニー刺激因子は、ある種の血小板減少症、すなわち、抗癌剤投与後の血小板減少症、放射線治療後の血小板減少症、巨核球系コロ

ニ一刺激因子欠損性による血小板減少症、再生不良性貧血の血小板減少症、骨髄移植後の血小板減少症の治療に有効に用いることができる。また巨核芽球性白血病細胞を巨核球へと分化させることにより、白血病の  
5 治療にも用いられる。さらに血小板輸血の代替、補助剤としても利用できる。本発明の均質な巨核球系コロニー刺激因子は腹腔内、静脈内又は皮下に投与することができ、慣用の各種の賦形剤と混和することにより各種の剤型の医薬組成物として投与できる。

10 又、本発明の巨核球系コロニー刺激因子の均質な精製品を利用して、本物質の部分アミノ酸配列を決定し、遺伝子クローニングのためのDNAプローブを作成することができる。

#### 図面の簡単な説明

15 第1図：本発明による巨核球系コロニー刺激因子の均質な精製品の製造例を例示する後記の実施例4において、先の段階で部分的精製された巨核球系コロニー刺激因子を、疎水性担体 TSKgel Phenyl-トヨパール 650(東ソー社製)を用いた疎水性クロマトグラフィー  
20 により更に精製する段階で溶出された各々の溶出画分が示す巨核球系コロニー刺激活性(破線で示す)と280nmの波長の紫外線(UV)の吸光度(実線で示す)とが溶出画分の溶出順序につれて関連的に変動する様子を表わすクロマトグラムを示す。

25 第2図：後記の実施例4での疎水性クロマトグラフ

イー精製段階で部分精製された巨核球系コロニー刺激因子を、吸着剤としてヒドロキシアパタイトカラム（関東化学社製）で更に精製する際に、溶出された各々の溶出面分が示す巨核球系コロニー刺激活性（破線で示す）と280nmの波長の紫外線（UV）の吸光度（実線で示す）とが溶出面分の滞留時間につれて関連的に変動する様子を表わすクロマトグラムを示す。

第3図：後記の実施例4でのヒドロキシアパタイトカラムによる精製段階で精製された巨核球系コロニー刺激因子を、イオン交換体Mono Q（Pharmacia社製）を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより更に精製する段階で、溶出された各々の溶出面分の巨核球系コロニー刺激活性（破線で示す）と280nmの波長の紫外線（UV）の吸光度（実線で示す）とが溶出面分の滞留時間につれて関連的に変動する様子を表わすクロマトグラムを示す。

第4図：後記の実施例4でのMono Qカラムによる精製段階で精製された巨核球系コロニー刺激因子を、陽イオン交換体IEC SP-420N（昭和電工社製）を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより更に精製する段階で、溶出された各々の溶出面分の巨核球系コロニー刺激活性（破線で示す）と280nmの波長の紫外線（UV）の吸光度（実線で示す）とが溶出面分の滞留時間につれて関連的に変動する様子を表すクロマトグラムを示す。

第5図：後記の実施例4で得られた最終精製品の巨

核球系コロニー刺激因子を還元剤の存在下、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用いて分析した電気泳動図を示す。本因子の単一バンドが図示されてある。なお、矢印は標準に用いた蛋白質の泳動位置を表わし、矢印の数字は標準の蛋白質の分子量 (キロダルトン) を表わす。

#### 実施例 1

本発明によりヒト由来肺大細胞癌細胞株を培養して得た培養液上清中に存在する巨核球系コロニー刺激活性を下記の 2 つの方法、すなわちヒト血漿凝塊法とマウスフィブリン凝塊法で検討した。

##### (1) ヒト血漿凝塊法

ウシ血漿 20  $\mu$ l、ヒト AB 型血漿 40  $\mu$ l、ウシ血清アルブミン 4 mg、2-メルカプトエタノール 10  $\mu$ M、ヒト骨髓単核球  $2 \times 10^5$  個、およびアッセイすべき巨核球系コロニー刺激因子含有又は非含有のサンプル 40  $\mu$ l を含むイスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's modified Dulbecco's medium、IMDM と略記される) 360  $\mu$ l に塩化カルシウム溶液 (2.6  $\mu$ g/ml) 40  $\mu$ l を加えて、直ちにその混合物を、35mm のシャーレ中央に置いて凝塊にさせる。この凝塊の周囲に 0.6ml の IMDM を入れた。アッセイすべき上記サンプルは、ヒト由来肺大細胞癌細胞株 PC-13 株細胞の培養液上清と、PC-13 株細胞の培養に用いた RPMI-1640 培地 (ブランクコントロールとして) と、また、ポジティブコントロールとして、ヒト巨核球系

コロニー刺激活性を持つことが知られる、インゲンマ  
メレクチンで刺激したヒト末梢リンパ球培養液上清  
(PHA-LCM) との夫々であった。前記凝塊の入ったシャ  
ーレを37℃、5%CO<sub>2</sub>を含む空気の存在下で12日間イ  
ンキュベートした。凝塊中に形成された巨核球系コロ  
ニーを抗ヒト第Ⅷ因子抗体(Dakopatts社製)で同定し  
ながら、ヒト巨核球系コロニー刺激活性(Meg-CSA)を  
測定した。その結果を次の第1表に示す。PC-13株細  
胞の培養液上清は、PHA-LCMと同様に、ヒト巨核球系  
コロニー刺激活性を持つことを確認した。

第1表

サンプル	ヒトMeg-CSA(CFU/ml)
RPMI-1640培地	0.5
PC-13株培養液上清	43
PHA-LCM	125

## (2) マウスフィブリン凝塊法

ウシ胎児血清80μl、ウシフィブリノーゲン(Sigma  
社製)0.2mg、ウシトロンビン(Sigma社製)0.2単位、  
BDF<sub>1</sub> オスマウス骨髓細胞 2×10<sup>5</sup>個、およびアッセイ  
すべき巨核球系コロニー刺激因子含有又は非含有のサ  
ンプル40μlを含むIMDM400μlの混合物を混合後にす  
ばやく35mmのシャーレの中央に置き、その混合物を凝  
塊にさせる。その周囲に0.6mlのイスコフ改変ダルベ  
ッコ培地(IMDM)をいれた。アッセイすべき前記サンプ  
ルは、ヒト由来肺大細胞癌細胞株 PC-13株細胞の培養

液上清と、PC-13 株細胞の培養に用いたRPMI-1640 培  
 地(ブランクコントロールとして)と、また、ポジティ  
 ブコントロールとして、マウス巨核球系コロニー刺激  
 5 活性を持つことが知られる、マウス骨髓単球白血病細  
 胞培養液上清(VEHI-CM) との夫々であった。前記の凝  
 塊の入ったシャーレを37℃で5 %CO<sub>2</sub> を含む空気の存  
 在下で6日間インキュベートした。凝塊中に形成され  
 た巨核球系コロニーをアセチルコリンエステラーゼ染  
 10 色で同定しながら、マウス巨核球系コロニー刺激活性  
 を測定した。その結果を次の第2表に示す。PC-13 株  
 細胞培養液上清は、VEHI-CM と同様に、マウス巨核球  
 系コロニー刺激活性を持つことを確認した。

第2表

	<u>サンプル</u>	<u>マウスMeg-CSA(CFU/ml)</u>
15	RPMI-1640培地	1±1
	PC-13株培養液上清	36±4
	VEHICM	49±9

## 実施例2

対数増殖期のPC-13株細胞を、牛胎児血清 10%を含  
 20 む RPMI-1640培地中に、2細胞/mlの濃度に調整して  
 懸濁した後、その細胞懸濁液を96穴マイクロプレート  
 に 0.1ml/穴ずつ分注し、37℃で5 %CO<sub>2</sub> の存在下に培  
 養した。

こうして各穴の中で培養して得られた単一クローン  
 25 細胞、計57株を別々に分け取り、増殖させ、増殖され

た57株の細胞を夫々に、牛胎児血清5%を含む RPMI-1640培地の 20mlアリコート中に  $1 \times 10^5$  細胞/mlの濃度で接種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> の存在下で4日間培養を行った。

- 5       これらの培養液上清を、1/20濃度のダルベッコ PBSにて透析して脱塩した後に凍結乾燥した。このように得られた巨核球系コロニー刺激因子を含む粗粉末を1mlの蒸溜水に溶解し、夫々の溶液について、そのマウス巨核球系コロニー刺激活性を前記のマウスフィブリン凝塊法にて評価した。その結果、上記のように得られたPC-13株の培養液上清の乾燥品の水溶液は270 CFU/mlの活性を示したが、これと比べて巨核球系コロニー刺激因子産生能の高い単一クローン株の培養液上清の乾燥品の水溶液は 470CFU/mlの活性を示した。この単一クローン株は高生産能クローン株として得られたことになり、これをヒト肺大細胞癌細胞株MC-1株と称した。
- 10
- 15

- このヒト肺大細胞癌細胞株MC-1株は日本国、茨城県つくば市にある「微生物工業技術研究所」にブダペスト条約の規定下にFERM BP-2574の寄託番号で寄託されている。
- 20

### 実施例 3

- ヒト由来肺大細胞癌細胞である前記のMC-1株細胞を下記の第4表の組成をもつ無血清培地（即ち、前記の RPMI-HPTS培地）中に、 $1 \times 10^5$  細胞/mlの濃度で、37
- 25

℃、5 % CO<sub>2</sub> の存在下で4日間培養した。その後、培養物から100mlの培養液上清を回収した。得られた培養液上清は、アッセイすべきサンプルとして用い、この上清を1/20濃度のダルベッコPBSにて透析により脱塩し、凍結乾燥した。こうして得られた巨核球系コロニー刺激因子を含む得られた乾燥粉末を5mlの蒸留水に溶解した。得られた水溶液のマウス巨核球系コロニー刺激活性をマウスフィブリン凝塊法にて評価した。その結果を下記の第3表に示す。コントロールは、MC-1株細胞の接種を省略した以外はRPMI-HPTS培地を前と同様の処理に付したものをを用いた。

その結果、無血清培地においても、MC-1株細胞が巨核球系コロニー刺激因子を産生することが明らかになった。

15

第3表

<u>サンプル</u>	<u>マウスMeg-CSA(CFU/ml)</u>
MC-1株培養液上清	640±70
RPMI-HPTS培地(コントロール)	17±10

20

25



## 第 4 表

RPMI-HPTS培地の組成 (100当り)

	・ RPMI-1640培地(粉末の形として、日水製薬社製)	104g
	・ 炭酸水素ナトリウム (ナカライテスク社製)	12g
5	・ ペニシリン G (明治製菓社製)	400mg
	・ ストレプトマイシン (明治製菓社製)	400mg
	・ トランスフェリン (Boelinger社製)	50mg
	・ 亜セレン酸 (ナカライテスク社製)	200 $\mu$ g
	・ ビルビン酸ナトリウム (Sigma社製)	1.0mM
10	・ HEPES (ナカライテスク社製)	15.0mM

## 実施例 4

本例は、巨核球系コロニー刺激因子高産生能クローン株であるヒト肺大細胞癌細胞株MC-1株を培養し、その培養液上清より巨核球系コロニー刺激因子を回収し精製するのに好適な方法を例示する。

## (1) 培 養

実施例 2 で得られたMC-1株(FERM BP-2574)を、牛胎児血清 5 % を含む RPMI-1640培地 (日水製薬社製) にて、 $1 \times 10^5$  個の細胞が得られるまで、シャーレ中、37℃、5 % CO<sub>2</sub> の存在下に水蒸気を飽和された空気下で増殖させた。これら MC-1株細胞を、ダルベッコPBSにて洗浄後、トリプシン-EDTA溶液(GIBCO社製) を作用させ、2 ~ 5 分後、トリプシンインヒビター(Sigma社製) にて、酵素反応を停止した。ピペッティングに

て培養器壁から剥離、回収した細胞は、ダルベッコ PBS にて洗浄後、使用する無血清培地に浮遊させ、細胞数をカウント後、接種細胞として使用した。

巨核球系コロニー刺激因子生産の為の培養に使用される無血清培地は、RPMI-1640 培地を基本培地として含む前記のRPMI-HPTS培地である。

培養容器には、組織培養用角シャーレ (25×25cm, Nunc社製) で、その内壁面をコラーゲン (CELLMATRIX-1P; IWAKI社製) で処理したものを用いた。MC-1株細胞は、あらかじめ、シャーレに125mlのRPMI-HPTS培地を入れてから37℃、5%CO<sub>2</sub>の存在下で水蒸気飽和空气中でインキュベートしたシャーレ100枚に、 $1 \times 10^7$ 細胞/シャーレの割合で接種した。これらのシャーレ中の細胞を、37℃、5%CO<sub>2</sub>の存在下で水蒸気飽和空气中で培養した。この培養中は3～4日間隔で8回、培地交換を行い、計100リットルの細胞培養液上清を回収した。

## (2) 培養液上清からの活性物質の回収

培養液上清は、濾過後、その濾液をカラム1本当りに25リットルずつ、10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (φ90×60mm, 生化学工業社製) に60ml/min. の流速で通過させ、活性物質をヒドロキシアパタイトに吸着させた。3200mlの10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) で流速80ml/min. にてカラムを洗浄後、0.5Mリン酸カリウム緩

衝液 (pH 7.5) で流速  $3.5\text{ml}/\text{min.}$  で溶出を行った。

(3) ConA-アガロースカラムクロマトグラフィー

前段階の溶出液を直接、 $10\text{mM}$ リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) にて平衡化した ConA-アガロースカラム ( $\phi 22 \times 310\text{mm}$ , 生化学工業社製) に流速  $3.5\text{ml}/\text{min.}$  で通過  
5 させてカラムからの通過液を集めた。通過液は、 $35\text{ml}$  ずつの画分として集め、それぞれの通過の画分の紫外線 ( $280\text{nm}$ ) の吸光度を測定してモニターを行い、UV 吸収のある通過画分を活性画分として採取した。この活性画分の紫外線 ( $280\text{nm}$ ) の吸光度単位は  $2375$  であった。  
10 透析による脱塩後の活性分画は合計で  $50 \times 10^5 \text{CFU}$  の Meg-CSA を有した。

(4) 疎水性クロマトグラフィー

ConA-アガロースカラム通過の活性画分  $1250\text{ml}$  に、  
15 硫酸アンモニウムを  $40\%$  飽和になるように加え、 $1$  時間攪拌後、遠心上清を得た。この上清を  $20\text{mM}$  トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) +  $40\%$  飽和硫酸アンモニウムで平衡化したフェニルトヨパール 650S ( $\phi 50 \times 82\text{mm}$ , 東ソー社製) に  $8\text{ml}/\text{min.}$  の流速にて流し、活性物質をカ  
20 ラムに吸着させた。同緩衝液でカラムを洗浄した後、 $20\text{mM}$  トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) +  $40 \sim 0\%$  飽和硫酸アンモニウムの濃度勾配法で  $4\text{ml}/\text{min.}$  の流速にて溶出した。溶出液を  $40\text{ml}$  ずつの画分で集め、それらの各画分の紫外線 ( $280\text{nm}$ ) の吸光度とマウス巨核球コロ  
25 ニー刺激活性を測定して、各画分の溶出順序につれて

起る各画分のUV吸光度の変動と、巨核球系コロニー刺激活性の変動を添付図面の第1図に示した。UV吸光度の変動は実線の曲線で、活性の変動は破線の曲線で表す。以下、添付図面の第2図、第3図でも同様である。

5 他方、上記の溶出過程では、約25%飽和硫酸アンモニウムの塩濃度で溶出した活性画分を所要の活性画分として採取した。この活性画分中の紫外線(280nm)の吸光度単位は87であった(合計Meg-CSA:  $12.1 \times 10^5$  CFU)。

(5) ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー

10 前段の疎水性クロマトグラフィーカラムから採取された活性画分の 240mlを、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.2)+50mM塩化ナトリウムに対して透析を行った。透析液を50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.2)にて平衡化したヒドロキシアパタイトカラム(φ8×100mm、関東化学社製)に流速 1ml/min. で通過させて、活性物質をヒドロキシアパタイト(HA)に吸着させた。次いで  
15 カラムを50mM~300mMのリン酸カリウム緩衝液(pH 7.2)の濃度勾配法で流速 1ml/min. にて溶出した。溶出液は2mlずつ画分し、各画分の紫外線(280nm)の吸光度とマウス巨核球系コロニー刺激活性を測定して、その測定結果を各画分の滞留時間につれて起るそれらの値の変動として、添付図面の第2図に示した。約 225mMのリン酸濃度のところに溶出した活性画分を採取した。この活性画分の紫外線(280nm)の吸光度単位は2.3  
20 であった(合計Meg-CSA:  $7.9 \times 10^5$  CFU)。  
25

## (6) 陰イオン交換クロマトグラフィー

ヒドロキシアパタイトカラムから採取された活性画分 6 ml を、5 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) + 5 mM 塩化ナトリウムに対して透析を行った。透析液を、同緩衝液にて平衡化したイオン交換体 Mono Q HR 5/5 カラム (φ 5 × 50 mm, Pharmacia 社製) に 1 ml/min. の流速にて添加し、活性物質を Mono Q カラムに吸着させた。同緩衝液でカラムを洗浄した後、5 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) + 5 mM ~ 400 mM 塩化ナトリウムの濃度勾配法で 1 ml/min. の流速にて溶出した。溶出液を 500 μl ずつの分画で集め、各分画の紫外線 (280 nm) の吸光度とマウス巨核球系コロニー刺激活性を測定して、各分画の滞留時間につれて起る各分画の UV 吸光度の変動と巨核球系コロニー刺激活性の変動を添付図面の第 3 図に示した。約 200 mM の塩濃度で溶出した活性画分を採取した。この活性画分の紫外線 (280 nm) の吸光度単位は 0.13 であった (合計 Meg-CSA :  $3.4 \times 10^5$  CFU)。

## (7) 陽イオン交換クロマトグラフィー

Mono Q カラムから採取された活性画分の 0.45 ml に、10 mM MES[2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid]-NaOH 緩衝液 (pH 5.0) + 5 mM 塩化ナトリウムを 4.05 ml 添加し、この溶液を、同緩衝液にて平衡化したイオン交換体 IEC SP-420N カラム (φ 4.6 × 35 mm, 昭和電工 社製) に 0.22 ml/min. の流速にて添加し、活性物質を IEC SP-420N カラムに吸着させた。同緩衝液でカラムを

洗浄した後、10mM MES-NaOH 緩衝液(pH 5.0) + 5 mM ~  
1000mM塩化ナトリウムの濃度勾配法で 0.85ml/min.  
の流速にて溶出した。

5 溶出液を500  $\mu$ lずつの分画で集め、各分画の紫外線  
(280nm) の吸光度とマウス巨核球系コロニー刺激活性  
を測定して、各分画の滞留時間につれて起る各分画の  
UV吸光度の変動と巨核球系コロニー刺激活性の変動を  
添付図面の第4図に示した。約 400mMの塩濃度で溶出  
した活性画分を採取した。この活性画分の紫外線(280  
10 nm)の吸光度単位は0.0018であった(合計Meg-CSA:  $5.5 \times 10^4$  CFU)。

採取された活性画分を10mMリン酸ナトリウム緩衝液  
(pH 7.2) + 150mM 塩化ナトリウムに対して透析により  
脱塩すると、紫外線280nm の吸光度単位あたり  $3.0 \times$   
15  $10^7$  CFUの比活性をもつ巨核球系コロニー刺激因子を水  
溶性の最終精製品として含む水溶液を得た。

次の第5表には、上記の回収と精製の各段階で採取  
された活性分画が有する紫外線 (UV, 280nm) の吸光度  
の単位の値と、合計Meg-CSAの値(CFU)とを要約して示  
20 す。

第 5 表

	<u>回収と精製の各段階で 採取された活性画分</u>	<u>Meg-CSA (CFU)</u>	<u>UV (280nm) の吸光度 (吸光度単位)</u>
	上清からのHAによる		
5	回収の活性画分	---	-
	ConA-アガロース	50 ×10 <sup>5</sup>	2375
	疎水クロマトグラフィー	12.1×10 <sup>5</sup>	87
	HAクロマトグラフィー	7.9×10 <sup>5</sup>	2.3
	Mono Qクロマトグラフィー	3.4×10 <sup>5</sup>	0.13
10	SP-420Nクロマトグラフィー	5.5×10 <sup>4</sup>	0.0018

## 実施例 5

実施例 4 の最終段階で巨核球系コロニー刺激因子の最終精製品として得られた本発明の巨核球系コロニー刺激因子の特性を次の通り調べた。

## (1) 分子量

① 還元剤の存在下にドデシル硫酸ナトリウム・ポリ  
 アクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で上記の最  
 終精製品の巨核球系コロニー刺激因子 (以下、「本物質」  
 という) の分子量を測定した。その電気泳動図を添付  
 図面の第 5 図に示す。SDS-PAGEでの分子量の算定は、  
 分子量既知の標準蛋白としてのホスホリラーゼ b (分  
 子量 94,000)、牛血清アルブミン (同 67,000)、オボア  
 ルブミン (同 43,000)、カーボニックアンヒドラーゼ  
 (同 30,000)、大豆トリプシン・インヒビター (同

20,100)、 $\alpha$ -ラクトアルブミン(同14,400)との比較により行った。その結果、還元剤の存在下では「本物質」は単一のバンドを示し、その分子量は約20,000であった。

- 5       なお、「本物質」を2次元電気泳動法(O'Farrell法)にて分析したところ、本物質は pI 4.5~5.5, 分子量 20,000の位置に単一スポットとして検出された。これにより本物質が均質であることが明白である。

- 10       ② 高速液体クロマトグラフィーによるゲル濾過法を用いて、下記条件にて「本物質」の未変性条件下での分子量を測定したところ、分子量約23,000に相当する滞留時間24~25分で本物質が溶出されて、その溶出画分は紫外線(280nm) 吸収の単一ピーク及び活性の単一ピークを示すことを認めた。その結果、ゲル濾過法による
- 15       「本物質」の分子量は約23,000であった。

カラム: TSK gel G2000 SWXL

( $\phi 7.8 \times 300\text{mm}$ , 東ソー社製)

溶 媒: 10mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)

+150mM NaCl

- 20       流 速: 0.5ml/min.

- ゲル濾過法での分子量の算定は、分子量既知の標準蛋白としての牛血清アルブミン(分子量67,000)、オボアルブミン(同43,000)、カーボニックアンヒドラーゼ(同29,000)、リボヌクレアーゼA(同13,700)との比較
- 25       により行った。



## (2) 等電点

等電点クロマトグラフィーを用いて下記条件で等電点を測定したところ、「本物質」は、溶出された液のpHが4.5~5.5の位置で溶出されて、その溶出された  
5 分画は紫外線(280nm)吸収の単一ピーク並びに活性の単一ピークを示した。その結果、「本物質」はpI=4.5~5.5の等電点を持つことを認めた。

カラム：モノ P (Pharmacia 社製)

開始溶媒：25mM ビストリス・イミノ二酢酸

10 緩衝液 (pH 7.1)

展開溶媒：10% ポリバッファ-74・イミノ

二酢酸緩衝液 (pH 4.0)

流速：0.5ml/min.

## (3) 部分アミノ酸配列

15 「本物質」を、リジルエンドペプチダーゼを用いて消化し、その消化物を逆相クロマトグラフィーにより分離した。得られたペプチドを、気相蛋白シーケンサー (Applied Biosystems 社製、モデル477A) を使用した自動エドマン分解法によりアミノ酸配列の決定の  
20 試験にかけた。その結果、「本物質」の構成蛋白質は下記の部分アミノ酸配列を含むことが認められた。

Tyr-Glu-Asp-Glu-X-Pro

(但し、この配列中の X は未同定のアミノ酸残基を表わす)。

25 上記の式の部分アミノ酸配列は、既知のヒト蛋白質

の何れにも存在しないアミノ酸配列であるから、「本物質」が既知のヒト蛋白質と異なる新規な物質であることが確認された。

#### (4) 熱安定性

5 「本物質」をダルベッコPBS(日水製薬社製)中で、37℃、56℃、80℃にて、60分間保持した後、その残存のマウス巨核球系コロニー刺激活性を測定した。その結果を第6表に示す。80℃では「本物質」が不安定であった。

10

第 6 表

温 度	37℃	56℃	80℃
残存活性(%)	78	13	0

#### (5) 酵素に対する安定性

15 「本物質」を0.1M酢酸ナトリウム水溶液(pH 5.0)中で、不溶性ノイラミニダーゼ(Sigma社製)0.5単位で37℃、5時間処理し、その残存したマウス巨核球系コロニー刺激活性を調べた。「本物質」はノイラミニダーゼに対して安定であった。また「本物質」をダルベッコPBS(日水製薬社製)中で、キモトリプシン10 $\mu$ g/ml  
20 で37℃、4時間処理し、その残存したマウス巨核球系コロニー刺激活性を調べた。その結果を第7表に示す。「本物質」はキモトリプシンに対して不安定であった。

第 7 表

	酵 素	残存活性(%)
	無 添 加	100
	ノイラミニダーゼ	100
5	キモトリプシン	21

## (6) サイトカイン等の活性

「本物質」が既知のサイトカイン類、すなわちIL-1、IL-2、IL-6、TNF、EPOの各活性を有するかどうか検討した。各活性の測定性は以下の通りである。

## [IL-1]

IL-1感受性ヒトメラノーマ細胞株A375株を培養し、その細胞を「本物質」あるいは標準IL-1と共に4日間培養後、その増殖抑制の程度を、ニュートラルレッドによる生体染色法により調べた。標準物質との比較でIL-1の活性量を算出した。

## [IL-2]

マウスIL-2依存性細胞、CTLL-2株を培養し、その細胞を「本物質」あるいは標準IL-2と共に一晚培養後、 $[^3\text{H}]$ チミジンのパルスラベルを行った。標準物質との比較でIL-2の活性量を算出した。

## [IL-6]

B細胞由来のSKW6-C1株を培養し、その細胞を「本物質」あるいは標準IL-6と共に4日間培養した。IgM産生誘導をELISAによって測定し、標準物質との比較でIL-

6の活性量を算出した。

[TNF]

マウス繊維芽細胞、L929株を単層培養し、その細胞を「本物質」あるいは標準TNFと共に一晚培養後、  
5 [3H]チミジンのパルスラベルを行った。L929株細胞に生じた細胞傷害性を標準物質との比較で測定した。

[EPO]

マウス胎児肝細胞を、「本物質」あるいは標準 EPOの存在下、20時間培養後、培地を交換し[54Fe]クエン酸鉄のパルスラベルを行った。標準物質との比較で  
10 EPOの活性量を算出した。

上記の各々の測定結果を第8表に示す。

第8表

	<u>活 性</u>	<u>活性量の測定値</u>
15	IL-1	検出限界以下
	IL-2	"
	IL-6	"
	TNF	"
	EPO	"

20 (7) 抗原性

「本物質」が既知のサイトカインおよびホルモンと免疫学的に反応する性質を有するかを検討した。

まず、抗ヒトIL-1抗体による「本物質」の中和実験を行った。抗体として、ヒトIL-1 $\alpha$ 、ヒトIL-1 $\beta$ に対するウサギポリクローナル抗体（ゼンザイム社製）を  
25

5 用い、中和反応液中における中和抗体価は、200NU/ml  
になるように調整した。その結果、「本物質」は抗ヒ  
トIL-1 $\alpha$ 、同 $\beta$ 抗体によって処理してもその巨核球系  
コロニー刺激活性は低下せず、「本物質」は免疫学的  
に前記の抗体と反応しないことが判った。

また同様に、抗ヒトGM-CSF抗体、抗ヒトIL-3抗体に  
よる「本物質」の中和実験を行った。抗体としてヒト  
GM-CSF、及びヒトIL-3に対するウサギポリクローナル  
抗体（ゼンザイム社製）を用いた。その結果、「本物  
10 質」は抗ヒトGM-CSF抗体、抗ヒトIL-3抗体によって処  
理しても、活性は低下せず、前記の抗体と免疫学的に  
反応しないことが判った。更に「本物質」をラジオイ  
ムノアッセイ法にて調べたところ、「本物質」はプロ  
ラクチン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、成長ホルモン  
15 (GH)、インシュリン、バソプレッシン(ADH)、副腎皮  
質刺激ホルモン(ACTH)に対する抗体で検出されず免疫  
学的にこれらのホルモン類と異なる物質であることが  
判った。

#### (8) 界面活性剤に対する安定性

20 「本物質」が界面活性剤で処理した時に安定である  
かを検討した。即ち、「本物質」をダルベッコPBS中  
に入れて各種界面活性剤の存在下で、4℃で24時間イ  
ンキュベートした。インキュベートされた溶液から透  
析により界面活性剤を除去した後、その残存したマウ  
25 ス巨核球系コロニー刺激活性を調べた。その結果、

「本物質」は、2% SDS水溶液で処理すると、部分的に失活されて不安定であった。また、水に溶かした0.02% Tween® 20、0.01% Nonidet NP40 又は 0.01% Triton® X-100 等の非イオン系界面活性剤で処理した時は安定であった。この安定試験の結果を次の第9表に示す。

第9表

	界面活性剤	残存活性(%)
	Control	100
10	SDS	26
	Tween® 20	86
	Nonidet NP-40	90
	Triton® X-100	103

## 実施例6

15 実施例4で最終精製品として得た本発明の均質な巨核球系コロニー刺激因子の *in vivo* に於ける巨核球系細胞に対する効果を調べた。

## (1) マウス巨核球前駆細胞に対する効果

20 本巨核球系コロニー刺激因子を含まない、又は40 CFU、80CFUまたは160CFUの量で含む 0.2mlのPBS (Phosphate buffered saline)を、BDF<sub>1</sub>マウス(オス、8週齢)の腹腔内に単回投与した。投与後の経過時間が48時間後に、マウスを屠殺した。取出した脾臓中の巨核球前駆細胞(CFU-Meg)の数を測定した。巨核球前  
25 駆細胞の測定は、脾細胞を4mlのIMDMに浮遊させた細

- 胞懸濁液を5%、ポークウィードマイトージェン刺激脾細胞の培養液上清(PWM-SCM)を5%加えて行うマウスフィブリン凝塊法にて脾細胞を培養して行なった。PWM-SCMによって成熟したアセチルコリンエステラーゼ染色陽性細胞の数をカウントした。脾臓に含まれる巨核球前駆細胞(CFU-Meg)の数を算出した。これにより、本物質のCFU-Meg増殖活性の投与量依存性を調べた。その結果を次の第10表に示す。

第 10 表

10	本物質投与量	CFU-Meg数/脾
	0 CFU	4200±800 (100%)
	40 CFU	5600±1000(133%)
	80 CFU	6900±1300( 64%)
	160 CFU	8500±900 (202%)

#### 15 (2) マウス脾臓中の巨核球に対する効果

- 本発明の均質な巨核球系コロニー刺激因子を400CFU含む0.2mlの濃度で含むPBSを、C3H/HeJマウス(オス、8週齢)の腹腔内に単回投与した。投与後の経過時間が0、24、48、72時間後にマウスを屠殺した。取り出した脾臓中の巨核球数を直ちに測定した。この際、脾臓は10%ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋し、断面積が最大となるように切片を調製し、HE染色(ヘマトキシリン・エオジン染色)を行った後、顕微鏡下で染色された巨核球の数をカウントし、赤脾髄単位面積当たりの巨核球数を算出した。その結果を次の第11

表に示す。

第11表

	<u>経過時間</u>	<u>巨核球数/赤脾髄 1 mm<sup>2</sup></u>	<u>有意差</u>
	0 hr.	7.2 ± 2.2 (100%)	
5	24 hr.	10.4 ± 0.6 (144%)	p < 0.05
	48 hr.	8.7 ± 2.5 (120%)	
	72 hr.	13.0 ± 3.9 (179%)	p < 0.05

産業上の利用可能性

10 以上のように、本発明によれば、ヒト由来の肺大細胞癌細胞株を培養し、その培養液上清から前述の生理活性を有する巨核球系コロニー刺激因子(Meg-CSF)の均質な精製品を取得できた。この均質な巨核球系コロニー刺激因子は医薬として有用である。

15

20

25



## 請 求 の 範 囲

1. 下記の諸性質をもつことを特徴とするヒト細胞由来の均質な巨核球系コロニー刺激因子。

(a) 分子量：

5           ① ゲル濾過法で測定すると、本因子の分子量は約23,000である。

          ② SDS-PAGE法で還元剤の存在下で測定すると、本因子の分子量は約20,000である。

(b) 等電点：

10           等電点クロマトグラフィーで測定すると、本因子は等電点 $pI=4.5\sim 5.5$ を示す。

(c) 280nm の紫外線の吸光度単位あたり、本因子は少なくとも  $3 \times 10^7$  CFU の比活性を示す。

(d) 部分アミノ酸配列

15           本因子はその構成蛋白質に下記の部分アミノ酸配列を含む：

Tyr-Glu-Asp-Glu-X-Pro

(但し、この配列中の X は未同定のアミノ酸残基を表わす)。

20           2. ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株を培養し、得られた培養物から巨核球系コロニー刺激因子を含む培養液上清を回収し、その培養液上清から巨核球系コロニー刺激因子を採取し、それを均質な蛋白質の形まで精製することを特徴とする請求項1に記載の諸性質をもつ巨核球系コロニー刺激因子を製造する方法。

25

3. ヒト由来の細胞株が肺大細胞癌細胞 PC-13株又は肺大細胞癌細胞MC-1株である請求項2に記載の巨核球系コロニー刺激因子を製造する方法。

5

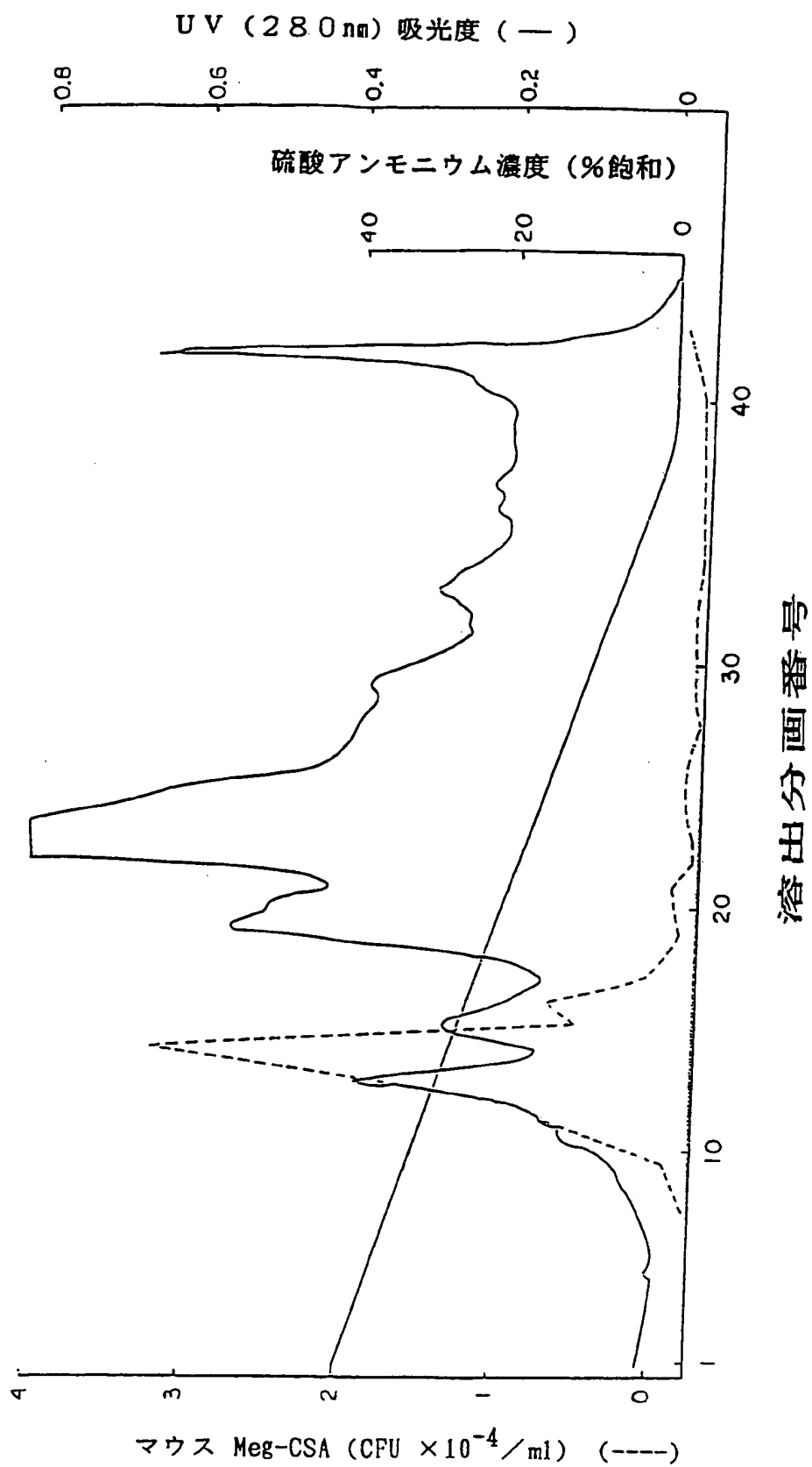
10

15

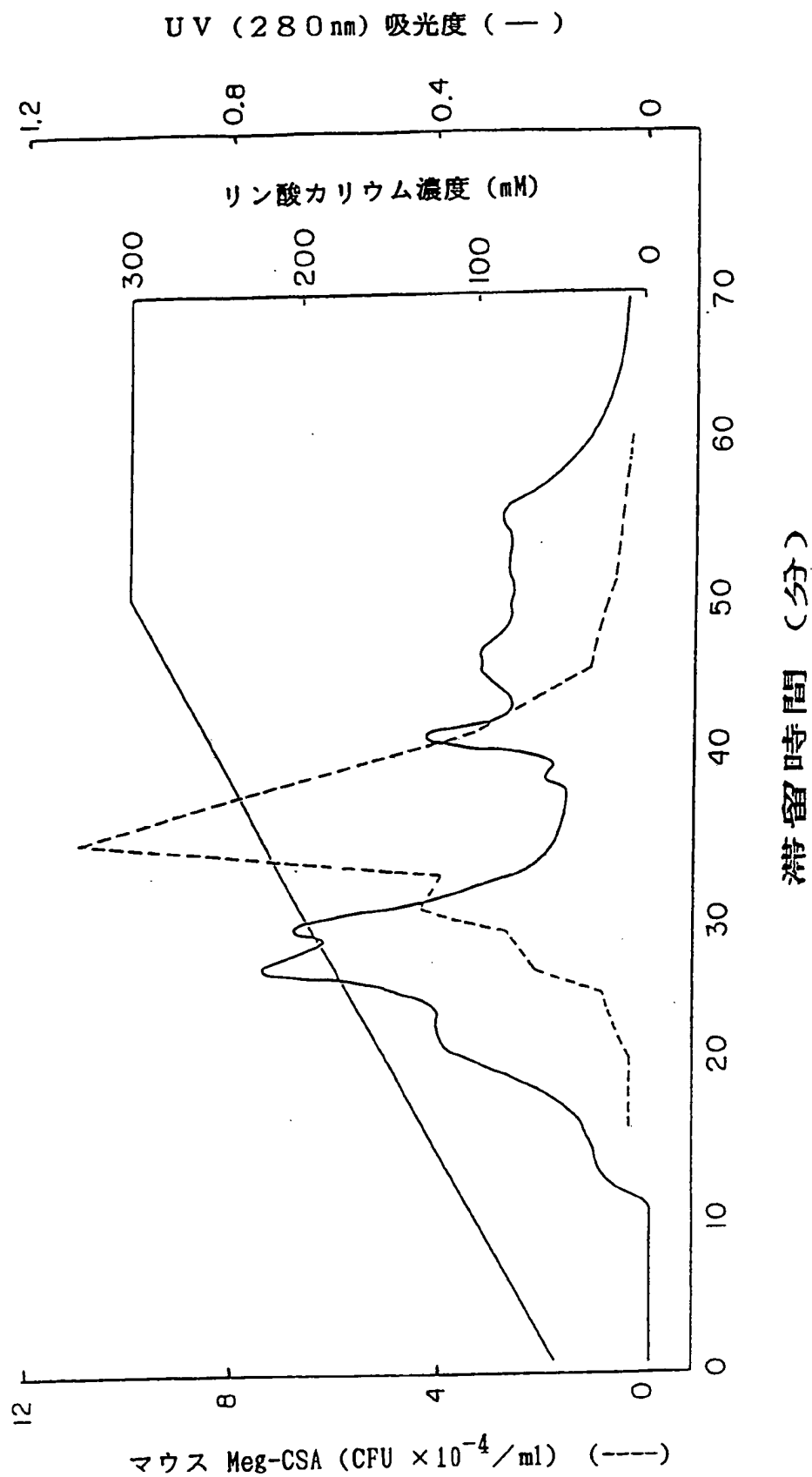
20

25

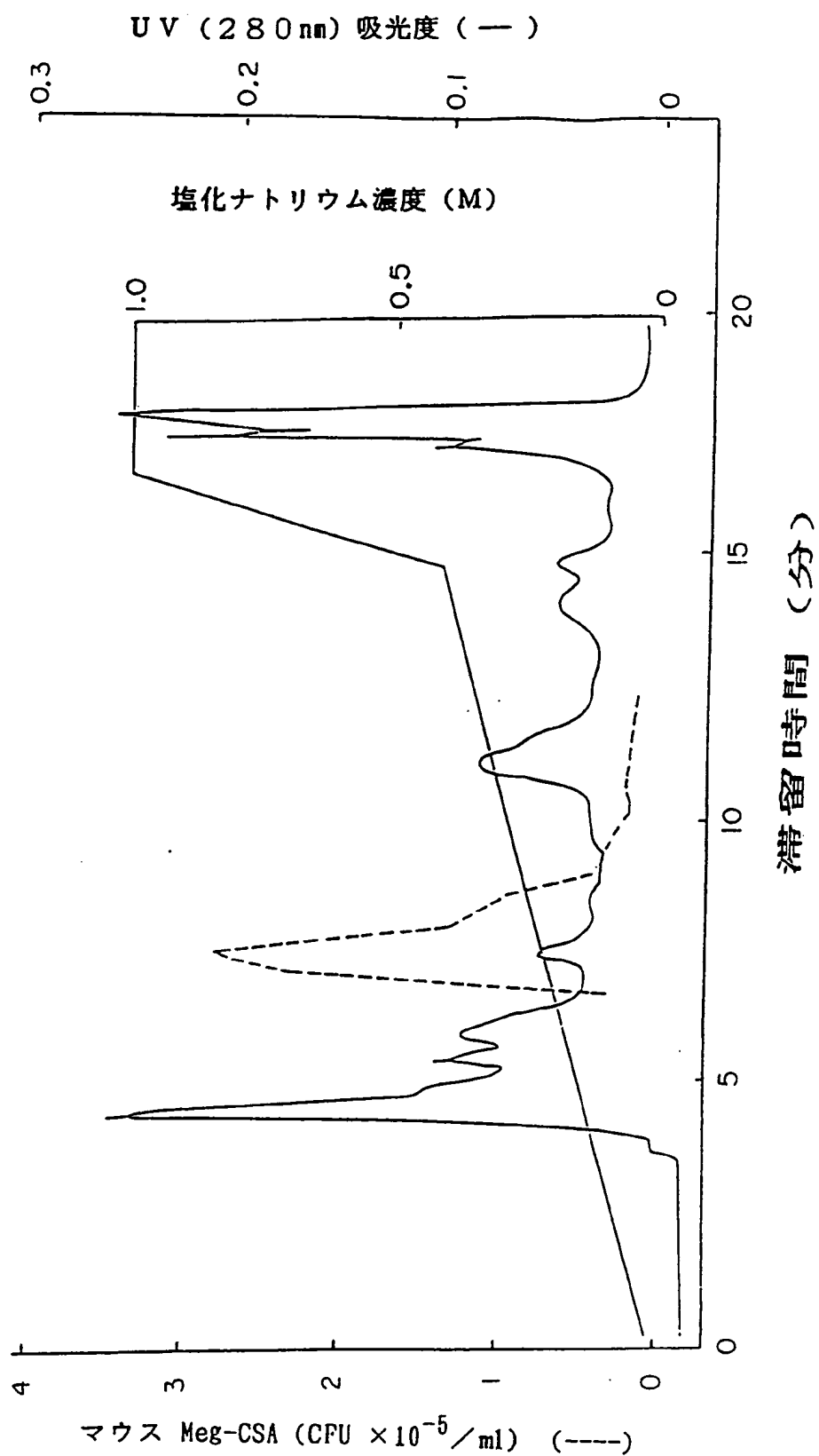
第 1 図



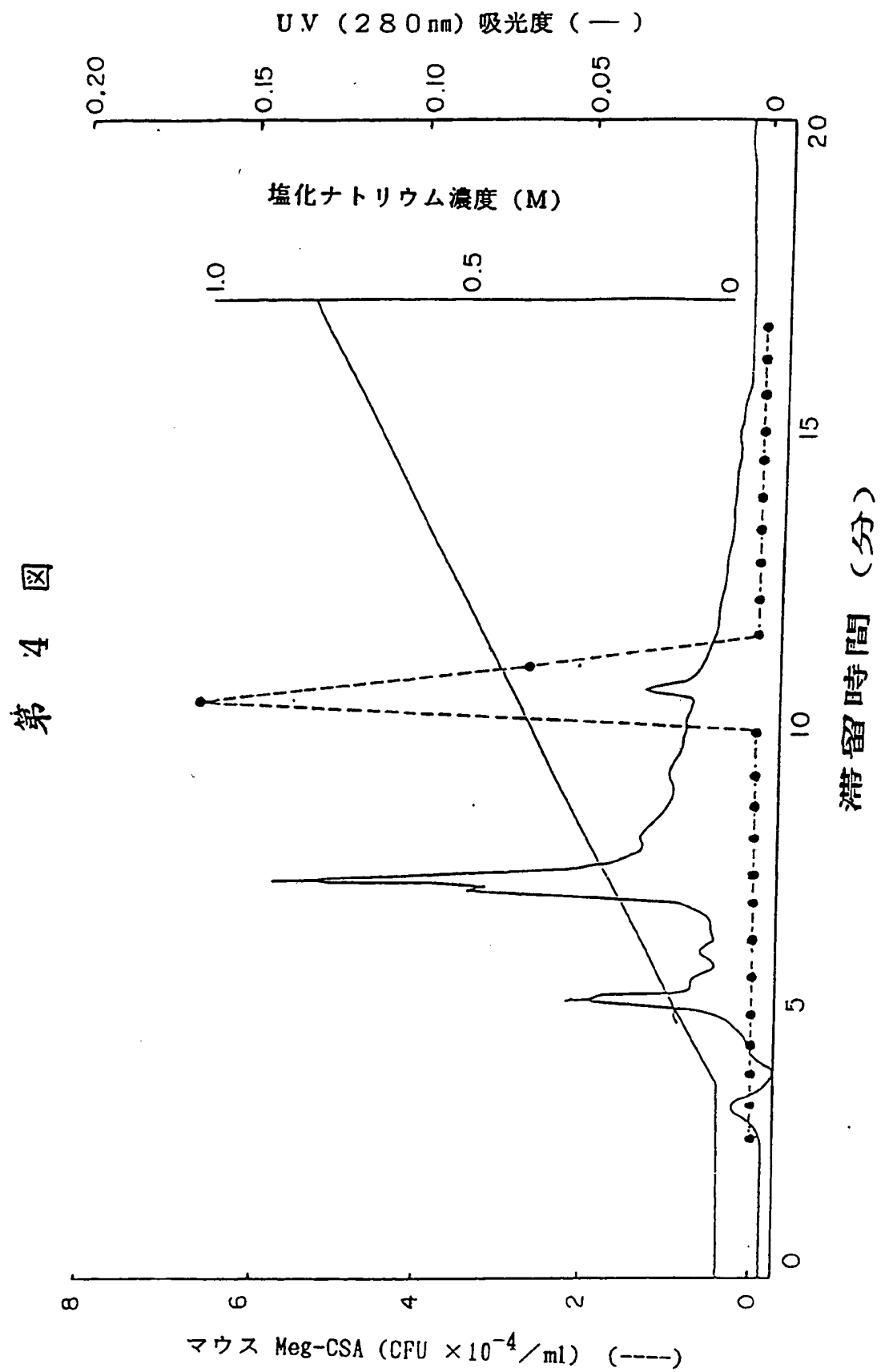
第 2 図



第 3 図

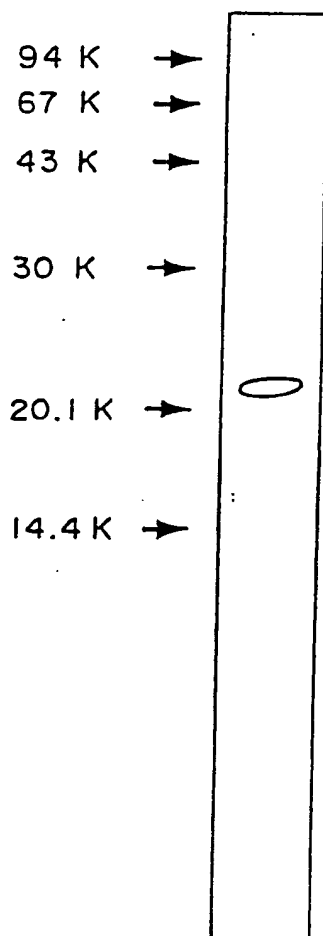


4 / 5



第 4 図

## 第 5 図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/00739

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>5</sup> C07K15/04, C12P21/02//A61K37/02 (C12P21/02, C12R1:91)		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07K15/04, C12P21/00, 21/02	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	WO, A1, 90/3397 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), April 5, 1990 (05. 04. 90)	1-3
<p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
August 20, 1991 (20. 08. 91)	September 9, 1991 (09. 09. 91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		



# 国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP91/00739

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C07K15/04, C12P21/02//A61K37/02 (C12P21/02, C12R1:91)		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C07K15/04, C12P21/00, 21/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X	WO, A1, 90/3397 (明治製菓株式会社), 5.4月.1990 (05.04.90)	1-3
※引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
20.08.91	09.09.91	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 2 1 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	内 田 俊 生

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**